动 物 学 研 究 1993, 14 (1): 80—85 ISSN 0254-5853
Zoological Research CN 53-1040 / Q

前环藻细胞核骨架及其真实性的研究*

方志林 吴传芬 李靖炎
(重庆师范学院生物系 630047) (中国科学院昆明动物研究所)

摘要 采用细胞成份的选择性抽提方法，结合常规电镜和 DGD (Diethylene Glycol Distearate) 包埋-去包埋电镜技术制备典型涡鞭毛虫前环藻的细胞核骨架，结果表明其核内存在一个蛋白性质的纤维网状结构，并且通过核纤层与中等纤维发生联系形成一个贯穿核质的骨架体系。即使在未经任何抽提处理的情况下，前环藻细胞的染色体之间仍然存在骨架结构。根据典型涡鞭毛虫的特点及细胞核骨架的定义，可以肯定其中包含了核骨架部分，这一实验结果排除了核骨架是因抽提处理造成结构假象的可能性；另外，在制备核骨架时，于选择性抽提液 CSK 液中加入 1%巯基乙醇抑制二硫键的形成，结果同样观察到核内有一个致密的纤维网络结构，并且与选择性抽提制备的核骨架相似，这也说明核骨架结构并不是由于蛋白质分子间二硫键的交联而造成的结构假象。以上结果都证明核骨架是一个真实存在的结构。

关键词：典型涡鞭毛虫，前环藻，细胞核骨架，选择性抽提，DGD包埋-切片去包埋技术

细胞核骨架是继胞质骨架之后在真核细胞核内发现的又一骨架体系。它是指细胞核经高盐溶液和核酸酶消化处理除去可溶性蛋白和 DNA 以后，残留下来的蛋白质纤维网状结构 (Berezney 等，1974)。目前，在各种高等真核生物的细胞中都发现了这一结构。在一些低等的真核生物如酵母 (Conrad 等，1984) 和纤毛虫 (Wunderlich 等，1977；Wolf，1980；鲍仕登等，1989) 中也发现了这一结构。但是迄今为止所有关于核骨架的资料基本上是以典型真核细胞为材料取得的。对于在细胞核的起源和进化研究上有特殊意义的低等真核生物涡鞭毛虫 (Dinoflagellate) 的细胞核中有无核骨架，国外还没有人作过检查。涡鞭毛虫类虽然也是真核，有核被膜与核仁，但是其染色体在结构与活动机制上却很近似于细菌的类核体 (李靖炎，1979)。现在已知在典型真核细胞中，核骨架参与着一系列的核内活动，如 DNA 复制 (Berezney 等，1975)、RNA 的合成 (Wunderlich 等，1976) 等。那么，涡鞭毛虫是否也具有核骨架结构，如果有，它和高等真核细胞的核骨架有什么区别，是否也与核内生命活动有关？这些问题对于理解和认识核骨架的起源与进化是必要的。其中首要的工作就是确定在涡鞭毛虫中是否存在核骨架结构。方志林等 (1989) 曾对典型涡鞭毛虫细胞核骨架的存在作了简要的报道。本文对此项工作作了进一步的介绍，并论证了在这类特殊的低等真核生物中核骨架结构存在的真实性。

材 料 与 方 法

1. 前环藻的培育 前环藻 (*Amphidinium carterae*) 最初由上海细胞生物学研究所庄

* 国家自然科学基金资助项目。
本文 1991 年 2 月 13 日收到，1992 年 5 月 12 修回。

孝德所长从美国带回，后在中国科学院昆明动物研究所长期培养。培养采用厄氏(Erdschreiber)培养基，另按2%的比例加定量的土壤浸出液和复合维生素混合液。接种后，在室温20℃左右的培养室培养，以日光灯为光源，光强为300 Lux，每日照射10 h。

2. 细胞成份的选择性抽提 采用Penman实验室发展和改进的细胞成份的选择性抽提方法（Capco等，1982；Fey等，1986）制备前环藻细胞的核骨架：①取接种培养3—4 d的前环藻培养液，在1000 r／min下离心5 min，弃上清液后，用4℃的CSK液（0.1 M NaCl、0.3 M蔗糖，10 mM PIPES，3 mM $MgCl_2$，1.2 mM PMSF，1 mM EGTA，0.5% Triton X-100，pH＝7.2）在冰浴中处理15 min；②经CSK液处理后，1000 r／min离心5 min，弃上清液后，用4℃的EXTR液〔0.25 M $(NH_4)_2SO_4$，0.3 M蔗糖，10 mM PIPES，3 mM MgCl，1.2 mM PMSF，1 mM EGTA，0.5% Triton X-100，pH＝7.2〕在冰浴中处理15 min；③经CSK液和EXTR液两步处理后，1000 r／min离心5 min，弃上清液后，用浓度为100 μg／ml的DNase溶液20℃下处理1 h，加入0.25 M $(NH_4)_2SO_4$停止反应；④经上述各步处理后，用浓度为25 μg／ml的RNase溶液在20℃下处理1 h。

材料在每步处理之后都留下一些，用含2.5%戊二醛的CSK固定液（pH＝7.2）固定1.5 h。

3. 常规环氧树脂包埋及DGD包埋—去包埋

①常规环氧树脂包埋电镜制样 材料经戊二醛固定后，用0.1 M二甲胂酸钠缓冲液(pH＝7.2)洗3次，1% OsO_4后固定1.5 h。再用缓冲液洗3次，酒精梯度脱水，环氧树脂812浸透和包埋（包埋剂配方：Epon 812：NSA＝1：1.6，Dmp-30 2%），切片厚度500—700 Å，经醋酸铀饱和溶液染色后，在H-300透射电镜下观察。

②DGD包埋-去包埋电镜制样 材料经双固定后，酒精梯度脱水至无水酒精，后在无水酒精：纯正丁醇（2：1及1：2）混合液中处理各15 min，纯正丁醇中换4次，每次15 min，纯正丁醇：DGD（2：1及1：2）混合液中60℃下处理各20 min，最后转入纯DGD中，60℃下浸透，换3次，每次1 h。室温下凝成块后，LKB切片机切片，厚度在600 Å以上，捞在喷碳的铜网载膜上。切片用纯正丁醇在室温下处理3—4 h（视切片厚度而定）即可溶去DGD，无水酒精中停留30 s，转入醋酸异戊脂中，经日立HCP-2型CO_2临界点干燥仪干燥后，在H-300透射电镜下观察。

不经任何抽提处理直接固定的细胞以及用含1%巯基乙醇的CSK液抽提后固定的细胞的电镜制样方法同上。

结　果

不经任何抽提的细胞通过常规电镜技术和DGD包埋-去包埋技术都能清楚地显示出细胞的膜系统、染色体等结构。但是，常规电镜切片中所显示的核质中虽然也有一些短纤维和颗粒结构，但它们之间的关系模糊不清（图版Ⅰ：1b）。在DGD包埋-去包埋切片上虽然材料未经染色，却能很清楚地显示出核质中致密的纤维网络结构（图版Ⅰ：1a），后者由相互连接的纤维与颗粒结构构成，实际上主要是核骨架。图像显然比环氧树脂包埋切片得到的结果要清晰，并且反映出的细微结构也较多。

CSK 液处理除去了细胞内的一些可溶性蛋白质、在 DGD 切片上可以看出、此时染色体仍是完整的、染色体之间的纤维网络与直接固定的材料相似、但显得稀疏一些（图版Ⅰ：2a)。

为了防止蛋白分子之间二硫键的形成而造成假象。用含 1%巯基乙醇的 CSK 液抽提细胞。经此步处理后，在 DGD 切片上（图版Ⅰ：2b）可以看出、前环藻细胞核内仍然保持有一个致密的纤维网络结构，和未经任何抽提处理的材料（图版Ⅰ：1a）相比，结构显得稀疏一些，但没有本质的差别；与只经 CSK 液抽提处理的材料（图版Ⅰ：2a）相比，在形态特征上极为相似、这就排除了核内这一骨架结构是由于蛋白质分子间二硫键交联造成的假象的可能性。

用 EXTR 液处理使细胞内的蛋白进一步除去、包括微管、微丝以及染色体中的碱性蛋白等，而中等纤维能够抗盐抽提而保留下来。在 DGD 切片上可观察到，经过 CSK 液和 EXTR 液双重处理后、核内物质（图版Ⅰ：3）比未经抽提者（图版Ⅰ：1a）以及只经 CSK 液抽提者（图版Ⅰ：2a）更为稀疏，染色体仍保持完整，染色体之间的网架与未经抽提以及只经 CSK 液抽提的结果实际上是一样的，差别只在于纤维上粘连的物质经两步抽提后要少些。核纤层结构也比较明显，且将中等纤维和核骨架纤维联系起来，形成一个连续的网络（图版Ⅰ：3)，形态上很象 Fey 等人在高等真核细胞中描述的核骨架中等纤维体系（NM–IF）(Fey 等，1986)。

经上述两步处理后，再对材料进行 DNase 溶液消化处理以除去 DNA 及其所联系的蛋白质。在 DGD 切片中（图版Ⅰ：4）可观察到、细胞核基本结构完整，但染色体已不复存在。这是因为在典型涡鞭毛虫类的染色体除去 DNA 以后、与之相连的蛋白质也会随之丢失（这是典型涡鞭毛虫染色体与真细菌的类核体的一个相同之处）。细胞核内剩下的是由纤维和一些颗粒构成的网络结构，纤维粗细不等、细纤维的直径在 3 nm 左右，粗纤维估计是细纤维的聚合体。另外，仍能较清楚地看到"中等纤维–核纤层–核骨架"体系。

经过上述三步处理后，对材料再进行 RNase 液处理。在 DGD 包埋–去包埋切片中（图版Ⅰ：5）可观察到核内网架结构遭到了破坏，纤维结构变成了一些不规则的聚集物，说明 RNA 对核骨架三维结构的维持是必需的。这和在高等真核细胞中的实验结果相似。

讨　论

自核骨架被发现以来，对其存在的真实性一直有争议。在典型真核生物的间期细胞核中、必须除去染色质才能显示出核骨架。因此有人怀疑核骨架是细胞在抽提处理过程中形成的结构假象。Aaronson 等采用与 Berezney 和 Coffey 采用的相似方法处理细胞就没有观察到核骨架（Aaronson 等，1975)。典型涡鞭毛虫（甲藻）在整个细胞周期中其染色体始终处于凝集状态，其转录是通过染色体临时伸出的 DNA 侧环完成的，因此在间期中 DNA 纤维基本上全部包装在染色体中，只有极少量正在进行转录的 DNA 纤维会伸出到染色体周围，染色体之间的区域几乎全是蛋白质和 RNA 成份。这一特点为证明核骨架的真实存在提供了可能。因为在未经任何抽提的情况下，如果染色体间存在骨架结构，根据核骨架的概念，就可以肯定这一骨架结构中包含了核骨架部份。以典型涡鞭毛虫前环藻为材料，采用戊二醛锇酸双固定，结合 DGD 包埋–切片去包埋技术显示出，即使不经任何

抽提处理，前环藻染色体之间仍然存在纤维网络结构（图版Ⅰ：1a）。这表明核骨架结构并非是细胞核在抽提处理过程中形成的。当然，这样显示出的核骨架，由于蛋白质基本上没有丢失，比起经过抽提得到的核骨架更致密，颗粒状物质也更多，这是很自然的。

Kaufmann 等曾认为核骨架可能是抽提制备过程中，核内分散的蛋白质分子上的巯基被氧化，在蛋白质分子间形成二硫键，使本来分离的蛋白质分子彼此交联起来，从而造成了核骨架样结构假象（Kaufmann 等，1981，1984）。针对这一问题，在进行选择性抽提时，于 CSK 液中加入 1%巯基乙醇以抑制蛋白质分子间二硫键的形成，结果在前环藻的细胞核内仍然有致密的骨架结构存在（图版Ⅰ：2b），这表明核骨架并非是由于分散的蛋白质分子间形成二硫键而造成的假象。Eekelen 等人以及 Fisher 等人的工作也同样表明了这一点（Eekelen 等，1982；Fisher 等，1982）。无论是在未经任何抽提处理直接固定的材料中，还是在 CSK 液中加入巯基乙醇抑制住二硫键形成的材料中，作者都观察到存在于前环藻核内染色体之间的网架结构，并且这些结果与通过细胞成份选择性抽提所得到的结果是相似的，没有本质的区别，因此，可以相信核骨架是真实存在的结构。

作者的实验结果表明在典型涡鞭毛虫前环藻中是有核骨架结构的。这一骨架结构与高等真核细胞的核骨架从形态上和组份上来看是相似的，两者都是分布于核内的网架结构，纤维的粗细也接近，都与胞质中等纤维有联系，RNA 对其结构的完整性是必需的。但前环藻的核骨架与另一种涡鞭毛虫尖尾藻（*Oxyrrhis marina*）的核骨架存在一些差别，尖尾藻细胞核经两步抽提及 DNase 消化除去 DNA 后，染色体并未完全消失，而是剩下一些纤维簇，并隐约可见原来染色体的外形轮廓（文建凡等，1992）。现在知道，前环藻与尖尾藻虽同属于涡鞭毛虫类，但它们在一系列特征上明显不同，如核分裂方式、染色体的超微结构、染色体中碱性蛋白的含量等方面；另外，尖尾藻中还具有类核小体的结构。尖尾藻的这些性质接近于典型的真核细胞，而与典型涡鞭毛虫不同。鉴于上述情况，有些学者认为应将尖尾藻从典型涡鞭毛虫类中划出，单独列为一个门。因此，前环藻与尖尾藻在核骨架结构上表现一些差异是可能的，具体的差异还有待进一步的研究。

典型涡鞭毛虫前环藻中细胞核骨架结构以及"中等纤维-核纤层-核骨架"网络的发现，为探讨它们的结构与功能关系以及进化发展等问题提供了结构基础。

致谢　电镜工作和实验材料得到刘德胜高级工程师、曾丛梅及保海仙同志的协助。

图 版 说 明

1a. 未经抽提的前环藻，DGD 包埋-去包埋制样，核（N）内纤维结构（F）密集，其上有颗粒结构（G），染色体（ch）分布其中，×28000

1b. 未经抽提的前环藻，常规电镜制样，可见核膜（ne）、染色体（ch），但核基质细微结构不明显，×20000

2a. 前环藻经 CSK 液处理，DGD 包埋-去包埋制样，可见核内密集的纤维结构（F）及染色体（ch），×34000

2b. 前环藻经含 1%巯基乙醇的 CSK 液处理，DGD 包埋-去包埋制样，核内纤维结构（F）及染色体（ch）仍存在，×34000

3. 前环藻经 CSK 液、EXTR 液两步抽提，DGD 包埋-去包埋制样，可见较为疏松的核内纤维结构（F）及染色体（ch）、核纤层（L），并可见胞质（C）中等纤维（IF）通过核纤层与核内纤维联系起来成为一个网络，×24000

4. 前环藻依次经 CSK 液、EXTR 液、DNase 处理，DGD 包埋-去包埋制样，核内纤维（F）更为疏松，染色体（ch）消失，核内纤维与核纤层（L）及中等纤维的联系仍存在，×38000

5. 前环藻依次经 CSK 液、EXTR 液、DNase、RNase 处理，DGD 包埋-去包埋，核内骨架结构破坏，形成一些不规则聚集物（P），×20000

参 考 文 献

鲍仕登，汪德耀 1989. 棘尾虫核基质与核周层的分离及基片结构和组成. 生物化学和生物物理进展，16: 206—208.

李靖炎. 1979. 细胞在生命进化历史中的发生——真核细胞的起源. 北京：科学出版社.

方志林，李靖炎. 1989. 中国细胞生物学学会第三次全国会议论文摘要汇编. 34.

文建凡，吴传芬，李靖炎. 1992. 特殊涡鞭毛虫——尖尾藻的核骨架. 动物学研究，13（1）: 89—94.

Berezney, R. and D. S. Coffey, 1974 Identification of an uclear protein matrix. *Biochem. Biophys. Res Commun.* 60: 1410—1417.

Conrad, M. N. and V. A. Zakian. 1984 Nuclear matrix involvment in DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae. J. Cell Biol* 99: 127a.

Wunderlich, F. and G. Herlan. 1977 A reversible contractile nuclear matrix, its isolation, structure, and composition. *J. Cell Biol.* 73: 271—278.

Wolfe, J. 1980 A possible skeletal substructure of the macronucleus of *Tetrahymena. J. Cell Biol.* 84: 160—171.

Berezney, R. and D. S. Coffey. 1975 Nuclear protein matrix: association with newly synthesized DNA. *Science* 189: 291—293.

Wunderlich, F., R. Berezney, and H. Kleinig. 1976 In Biological Menbrances, PP 241—331, Ed. D. Chapman and D. F. H. Wallach. London and New York: Academic Press.

Fey, E. G., G. Krochmalnic, and S. Penman. 1986 The nonchromatin substructures of the nucleus: the ribonucleoprotein (RNP) —containing and RNP—depleted matrices analyzed by sequential fractionation and resinless section electron microscopy. *J. Cell Biol.* 102: 1654—1665.

Capco, D. G., K. M. Wan, and S. Penman. 1982 The nuclear matrix: three—dimentional architecture and protein composition. *Cell* 29: 847—858.

Aaronson, R. P and G. Blobel. 1975 Isolation of nuclear pore complexes in association with a lamina. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72 (3): 1007—1011

Kaufmann, S. H., D. S. Coffey, and J. H. Shaper. 1981 Considerations in the isolation of Rat liver nuclear matrix, nuclear envelope, and pore complex lamina. *Exp. Cell Res.* 132: 105—123.

Kaufmann, S. H. and J. H. Shaper. 1984 A subset of non—histone nuclear proteins reversibly stabilized by the sulfhydryl cross—linking reagent tetrathionate. *Exp. Cell Res.* 155: 477—495.

Van Eekelen, C. A. G., M. H. L. Salden, W. J. A. Habets *et al.* 1982 On the existence of an internal nuclear protein structure in Hela cells. *Exp. Cell Res.* 141: 181—190.

Fisher, P. A., M. Berrios, and G. Blobel. 1982 Isolation and characterization of a proteinaceous subnuclear fraction composed of nuclear matrix, peripheral lamina, and nuclear pore complexes from embryos of *Drosophila melanogaster. J. Cell Biol.* 92: 674—686.

THE STUDY ON THE NUCLEAR MATRIX AND ITS REALITY OF *Amphidinium carterae*

Fang Zhilin

(*Department of Biology, Chongqing Teachers College* 630047)

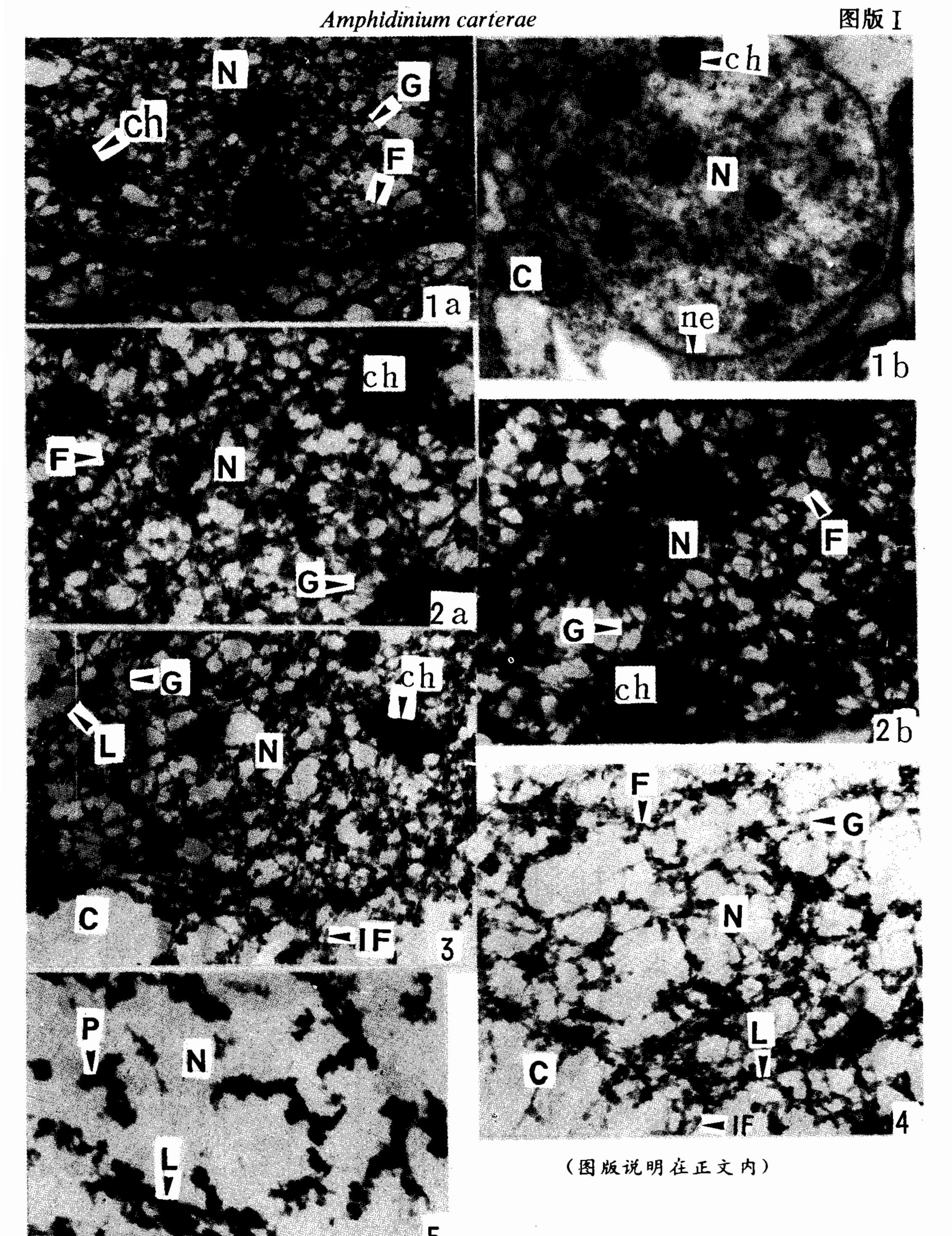
Wu Chuanfen Li Jingyan

(*Kunming Institute of Zoology, Academia Sinica* 650223)

With DGD embedment sectioning and embedment-free technique, We found that nuclear matrix also could be demonstrated in the nucleus of typical dinoflagellate Amphidinium carterae after a series of selective extractions and DNase treatment. The morphology of the nuclear matrix is similar to that of higher eukaryotic cells, and consisting a non-chromatin filamentous network and granular structures. However, it is noteworthy that, with DGD technique, even in the cells fixed directly without any prior extractions and treatments, a similar dense network of filaments could also be demonstrated in the nucleoplasma. It has long been known that, in typical dineflagellate nucleus, almost all of the DNA concentrate in the permanently condensed chromosomes. Therefore, at least most of the filaments are not chromatin fibrils, but nuclear matrix filaments. Besides, when the formation of sulfide links among protein molecules was protected by adding 1% mercaptoethol into the extraction buffer, the nuclear matrix also could be demonstrated. This fact rules out the possiblity that the nuclear matrix is an artifact produced by the formation of difulfide links among protein molecules. These facts above imply that the nuclear matrix in typical dineflagellate is a real physiological nuclear structure, rather than artifact produced during extractions and treatments.

Key words: Typical dinoflagellate, *Amphidinium carterae*, Nuclear matrix, Selective extraction, DGD embedment sectioning and embedment-free technique

图版 I



（图版说明在正文内）